

⑧ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ Offenlegungsschrift
⑩ DE 100 31 744 A 1

⑥ Int. Cl. 7:
C 07 K 14/805

DE 100 31 744 A 1

② Aktenzeichen: 100 31 744.8
② Anmeldetag: 29. 6. 2000
③ Offenlegungstag: 17. 1. 2002

⑦ Anmelder:
SanguBio Tech AG, 58455 Witten, DE
⑦ Vertreter:
Hansmann & Vogeser, 65929 Frankfurt

⑦ Erfinder:
Barnikol, Wolfgang, Prof. Dr., 55128 Mainz, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

④ Mit Blutplasma verträgliche, vernetzte und mit Polyalkylenoxiden konjugierte Säugetierhämoglobine als künstliche medizinische Sauerstoffträger, ihre Herstellung und ihre Verwendung

⑤ Die Erfindung betrifft kovalent vernetzte Säugetier-Hämoglobine, an die Polyalkylenoxide kovalent angeknüpft sind. Solche Hämoglobine sind überraschenderweise mit Proteinen menschlichen oder tierischen Plasmas verträglich. Die Erfindung betrifft weiterhin die Herstellung dieser vernetzten und mit Polyalkylenoxiden verknüpften Hämoglobine, sowie ihre Verwendung als künstliche intravasale Sauerstoffträger im menschlichen oder tierischen Organismus oder in einzelnen Organen.

DE 100 31 744 A 1

Best Available Copy

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft kovalent vernetzte Säugertier-Hämoglobine, an die Polyalkylenoxide kovalent angeknüpft sind. Solche Hämoglobine sind überraschenderweise mit Proteinen menschlichen und tierischen Plasmas bei sämtlichen im Gefäßsystem des Körpers möglichen Bedingungen verträglich. Die Erfindung betrifft ferner die Herstellung dieser vernetzten und mit Polyalkylenoxiden verknüpften Hämoglobine, sowie ihre Verwendung als künstliche intravasale Sauerstoffträger im menschlichen oder tierischen Organismus, in einzelnen Organen, oder für biomedizinische Zwecke. 5

[0002] Künstliche Sauerstoffträger sind Stoffe, die Sauerstoff in für einen Organismus geeigneter Weise reversibel 15 binden und freisetzen, sowie die Sauerstofftransportfunktion des Blutes ersetzen oder unterstützen können. Pharmazeutische Zubereitungen von Lösungen oder Suspensionen künstlicher Sauerstoffträger werden entwickelt, um zur Behandlung akuter und chronischer Sauerstoffmangelzustände 20 sowie akuter Blutverluste Menschen oder Tieren parenteral ins Gefäßsystem, insbesondere intravenös, verabreicht zu werden. Darüber hinaus können sie auch zur Perfusion von Organtransplantaten oder als Zusatz von Zellkulturen eingesetzt werden, um hier die Sauerstoffversorgung zu verbessern. 25

[0003] Künstliche Sauerstoffträger aus Hämoglobinen werden weltweit auf der Grundlage unterschiedlicher Konzepte entwickelt (Stand der Technik: Rudolph A. S. et al. (Hrsg.): *Red Blood Cell Substitutes: Basic Principles and Clinical Applications*, Marcel Dekker, New York u. a. 1998; Tsuchida E. (Hrsg.): *Blood Substitutes: Present and Future Perspectives*, Elsevier Science, Amsterdam 1998; Chang T. M. S. (Autor bzw. Hrsg.): *Blood Substitutes: Principles, Methods, Products and Clinical Trials*, Volume 1 und ~ Volume 35 2, Karger Landes, Basel u. a. 1997 und 1998). Allen Konzepten gemeinsam ist die Herstellung künstlicher Träger mit geeigneten Sauerstoffbindungseigenschaften, die den Sauerstofftransport *in vivo* gewährleisten können. Diese Eigenschaften richten sich nach dem gewünschten Anwendungsbereich des Trägers und orientieren sich zumeist an denen des menschlichen Blutes. Natives, extrazellulär gelöstes Hämoglobin ist als Sauerstoffträger nicht geeignet, da es intravasal in seine Untereinheiten zerfällt und diese auf Grund ihres niedrigen Molekulargewichtes schnell über die Niere ausgeschieden werden. Deshalb versucht man, die intravasale Verweildauer natürlicher oder gentechnologisch hergestellter Hämoglobine im Organismus zu verlängern. Verlängerungen der intravasalen Verweildauer ergeben sich durch 40

– Mikroverkapselung von Hämoglobinlösungen in Liposomen, sogenannte Hämösomen (Ogata Y. (1994): "Characteristics of Neo Red Cells, Their Function and Safety: In Vivo Studies", *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Immobilization Biotechnologies* 22: 55 875–881);

– kovalente intramolekulare Verknüpfungen, d. h. eine Stabilisierung der Quartärstruktur der Hämoglobine, durch bifunktionelle Vernetzer (Farmer M. C., et al. (1995): "Preclinical Data and Clinical Trials with Dispirin Cross-linked Hemoglobin", – Tsuchida E. (Ed.): *Artificial Red Cells*, John Wiley 1995: 177–185; Bakker J. C., et al. (1988): "Properties of Hemoglobin Interdimerically Cross-linked with NFPLP", *Biomaterials, Artificial Cells, and Immobilization Biotechnologies* 16: 635–636) oder durch gentechnische Gewinnung (Looker D. et al. (1992): "A Human Recombinant Haemoglobin Designed for Use as a Blood Substitute", 60 65

Nature 356: 258–260);

– kovalentes Anknüpfen von Makromolekülen an das Hämoglobin, beispielsweise Polysaccharide, Dextrane, Hydroxyethylstärke, Inulin oder künstliche wasserlösliche Makromoleküle wie Polyethylenglykole (Xue H., Wong J. T.-F. (1994): "Preparation of Conjugated Hemoglobins", – Abelson J. N., Simon M. I. (Ed.): *Methods of Enzymology*, Volume 231B, Academic Press 1994: 308–322; Tam S. C., et al. (1978): "Blood Replacement in Dogs by Dextran-Hemoglobin", Canadian Journal of Biochemistry 56: 981–984; Patentschriften DE-A 30 26 398 (1981): "Modifiziertes Hämoglobin enthaltender Blutersatz"; EP-A 0 069 026 (1982): "Oxygen Carrier"; EP-A 0 206 448 (1986): "Hemoglobin Combined with a Poly (Alkylene Oxide)"; US 5,234,903 (1993): "Chemically Modified Hemoglobin as an Effective, Stable, Non-immunogenic Red Blood Cell Substitute" und US 5,312,808 (1994): "Fractionation of Polyalkylene Oxide-Conjugated Hemoglobin Solutions");

– intermolekulares Vernetzen (Polymerisieren) der Hämoglobine mit bifunktionellen Vernetzern, (Gould S. A., et al. (1998): "The Clinical Development of Human Polymerized Hemoglobin", – Chang T. M. S. (Ed.): *Blood Substitutes: Principles, Methods, Products and Clinical Trials*, Volume 2, Karger Landes Systems 1998: 12–28; Pearce L. B., Gawryl M. S. (1998): "Overview of Preclinical and Clinical Efficacy of Biopure's HBOCs", – Chang T. M. S. (Ed.): *Blood Substitutes: Principles, Methods, Products and Clinical Trials*, Volume 2, Karger Landes Systems 1998: 82–98; Bakker J. C., et al. (1992): "Preparation and Characterization of Crosslinked and Polymerized Hemoglobin Solutions", *Biomaterials, Artificial Cells, and Immobilization Biotechnologies* 20: 233–241). Die letztgenannten künstlichen Sauerstoffträger auf der Basis vernetzter Hämoglobine besitzen gegenüber den anderen eine Reihe von Vorteilen: Ausreichend große vernetzte Hämoglobine (Hämoglobin-Polymer) verfügen über einen so geringen kolloid-osmotischen Druck, daß sie nicht nur – wegen ihres so geringen eigenen kolloid-osmotischen Druckes dann kombiniert mit einem Plasmaexpander – als Sauerstoff transportierendes Blutvolumensubstitut zum Ersatz fehlenden Blutes eingesetzt werden können, sondern insbesondere können sie auch – als Sauerstoff transportierendes Blutadditiv – in Blut addiert werden (Barnikol W. K. R., et al. (1996): "Hyperpolymere Hämoglobine als künstliche Sauerstoffträger. Ein innovativer Ansatz der medizinischen Entwicklung", Therapiewoche 46: 811–815). Indikationsgebiete für solche Sauerstofftransport-Additive sind die Behandlung vieler chronischer Sauerstoffmangelzustände, wie beispielsweise Anämien, Schlaganfälle oder Herzinfarkte. Die Behandlung mit einem solchen Additiv ist immer auch ohne einen Blutverlust möglich, dagegen sind sämtliche genannten anderen Sauerstoff transportierenden Volumensubstitute ausschließlich zur Behandlung akuter Sauerstoffmangelzustände nach Blutverlusten geeignet. Vernetzte Hämoglobine mit hohem Vernetzungsgrad besitzen darüber hinaus den Vorteil besonders langer intravasaler Verweildauer. Weiters muß nach ihrer Gabe nicht mit Blutdruckerhöhungen gerechnet werden, da sie auf Grund ihrer Größe die Blutgefäße nicht verlassen und somit nicht als Konstriktoren der Gefäßmuskulatur wirken können (s. w. u.).

[0004] Im Zentrum aller Entwicklungen steht, gleichwer-

tig neben der Wirksamkeit, immer auch die Evaluation und gegebenenfalls Verbesserung der Unbedenklichkeit der künstlichen Sauerstoffträger (Fratantoni J. C. (1991): "Points to Consider in the Safety Evaluation of Hemoglobin-based Oxygen Carriers", *Transfusion* 31: 369-371). Beispielsweise wird in narkotisierten Ratten nach intravasaler Applikation intramolekular vernetzter Hämoglobine eine Blutdruckzunahme und ein Anstieg des Totalen Peripheren Gefäßwiderstandes beobachtet (Sharma A. C., et al (1993): "Role of NO Mechanism in Cardiovascular Effects of Diazepin Cross-linked Hemoglobin in Anesthetized Rats", *American Journal of Physiology* 269: H1379-H1388). Diese vasokonstriktorische Wirkung molekular disperter künstlicher Sauerstoffträger kann sowohl auf einer Hyperoxygenierung des Gewebes durch die sehr effektiven Träger beruhen (Rohlf R. J., et al. (1998): "Arterial Blood Pressure Responses to Cell-free Hemoglobin Solutions and the Reaction with Nitric Oxide", *Journal of Biological Chemistry* 273: 12128-12134), oder auch auf die Inhibition der lokalen Wirkung des Stickstoffmonoxids (NO) durch Hämoglobine zurückgeführt werden (Sharma A. C., et al. (1993) - siehe oben), denn Stickstoffmonoxid wirkt auf die glatte Muskulatur der Gefäßwände dilatierend (Rodeberg D. A., et al. (1995): "Nitric Oxide: An Overview", *American Journal of Surgery* 170: 292-303). Hämoglobin verläßt auf Grund seines niedrigen Molekulargewichtes das Gefäßsystem, bindet subendothelial abgegebenes Stickstoffmonoxid und verschiebt damit das an der Gefäßmuskulatur herrschende Gleichgewicht zwischen Vasodilatation und Vasokonstriktion zu letzterer. Vernetzen von Hämoglobinmolekülen (zu Multimeren: Oligomere und Polymere) verhindert die Diffusion aus den Gefäßen und damit die Blutdruckerhöhung durch die künstlichen Träger (Vogel W. M., Valeri C. R. (1986): "Coronary Constrictor Effect of Stroma-free Hemoglobin Solutions", *American Journal of Physiology* 251: H413-H420). Weiters ist der Einfluss der künstlichen Träger auf das Gerinnungssystem, das Abwehrsystem, insbesondere die Komplementaktivierung, die Aktivierung des Retikuloendothelialen Systems und die spezifische Immunantwort von großem Interesse. Es konnte gezeigt werden (Ning J., Chang T. M. S. (1990): "Effects of Homologous and Heterologous Stroma-free Hemoglobin and Polyhemoglobin on Complement Activation, Leukocytes and Platelets", *Biomaterials, Artificial Cells, and Artificial Organs* 18: 219-233; Feola M., Simoni J. (1991): "Biocompatibility of Hemoglobin Solutions: The Effects of Contaminants, Hemoglobin and Hemoglobin Derivatives", *Biomaterials, Artificial Cells, and Artificial Organs* 19: 382), dass eine Komplementaktivierung nicht durch natives oder verknüpftes Hämoglobin selbst, sondern im wesentlichen durch Verunreinigungen, beispielsweise Endotoxine oder stromale Bestandteile der das native Hämoglobin zunächst enthaltenden Erythrozyten, ausgelöst wird. Somit kann der Einsatz hochreiner Ausgangslösungen zur Herstellung künstlicher Sauerstoffträger eine spätere Komplementaktivierung vermeiden.

[0005] Homologe Hämoglobine (Hämoglobine von den selben Tierspezies, denen es verabreicht wird), ob nativ oder vernetzt, wirken im Tiermodell auch nach wiederholter Gabe nicht immunogen, heterologe Hämoglobine (Hämoglobine von anderen als den Empfänger-Spezies) oder deren Vernetzungsprodukte können dagegen nach wiederholter Gabe eine Antikörperproduktion und anaphylaktische Reaktionen hervorrufen (Chang T. M. S. (1997): "How Safe are Modified Hemoglobins?", *Blood Substitutes: Principles, Methods, Products and Clinical Trials*, Volume 1, Karger Landes Systems 1997: 49-72). Verfahren zur Maskierung der Antigenität von Hämoglobinen sind die Mikroverkapselung oder die Konjugation mit Polyethylenglykol (z. B. Pa-

tentschrift US 4,179,337: "Non-immunogenic Polypeptides").

[0006] Im Rahmen der Untersuchung der Unbedenklichkeit künstlicher Sauerstoffträger wurde direkten Wechselwirkungen dieser mit Plasmaproteinen, mit denen sie bei intravasaler Anwendung in Kontakt kommen, bisher keine Beachtung geschenkt. In eigenen Untersuchungen konnte mit Hilfe eines neuen in vitro-Biokompatibilitätstests nachgewiesen werden, daß vernetzte Hämoglobine und Plasmaproteine in Abhängigkeit vom pH-Wert unterschiedlich verträglich sind. Es kommt zu Fällungen meist roter oder rötlich tingierter heller Präzipitate oder Niederschläge, die zu meist visuell erkennbar sind - weniger offensichtliche Fällungen können durch empfindliche Trübungsmessungen erfaßt werden. Diese Fällungen betreffen entweder überwiegend die vernetzten Hämoglobine oder die Plasmaproteine, oder gleichermaßen beide. Der allfällige Nachweis der Beteiligung der Plasmaproteine, also das Vorliegen von Wechselwirkungen zwischen vernetzten Hämoglobinen und Plasmaproteinen, ist gegeben, weil im Plasmaüberstand, z. B. elektrophoretisch, auch eine Abnahme des Gehaltes plasmatischer Proteine, insbesondere der γ -Globuline, gemessen werden kann. Das Ausmaß der Hämoglobinfällungen ist dabei u. a. abhängig vom Molekulargewicht der vernetzten Hämoglobine, vom verwendeten Hämoglobin und bifunktionellen Vernetzer, sowie dem Vorhandensein kovalent gebundener Effektoren der Sauerstoff-Bindungseigenschaften der Hämoglobine (Domack U. (1997): "Entwicklung und in vivo-Evaluation eines künstlichen Sauerstoffträgers auf Basis von Rinderhämoglobin." Dissertation, Fachbereich Chemie, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz 1997). Beispielsweise fallen von einem mit dem bifunktionellen Vernetzer Glutardialdehyd hergestellten, vernetzten Rinderhämoglobin mit einem mittleren Vernetzungsgrad um etwa 10 in Humanplasma bei pH-Werten kleiner als 7,5 größere Anteile aus. Die Modifikation der Sauerstoffbindungseigenschaften vernetzten Rinderhämoglobins durch kovalentes Anknüpfen von Pyridoxal-5'-Phosphat bewirkt eine weitere Herabsetzung der Plasmanverträglichkeit. In diesem Falle werden schon bei pH-Werten unter 8,0 Fällungen des Hämoglobins beobachtet. Mit Glutardialdehyd als Vernetzer hergestellt sind mit Pyridoxal-5'-Phosphat modifizierte, vernetzte Rinderhämoglobine nur bis zu einem Polymerisationsgrad von etwa fünf (Hämoglobin-Oligomere) im physiologisch relevanten pH-Bereich mit Humanplasma verträglich.

[0007] Ein positiver Einfluß auf die Bioverträglichkeit zwischen vernetztem Rinderhämoglobin und Humanplasma kann dagegen durch die Verwendung bifunktioneller Vernetzer erreicht werden, die bei der Polymerisation zusätzliche solvatisierende Gruppen einbringen. Beispielsweise sind mit dem Vernetzer 2,5-Diisothiocyanatobenzolsulfonsäure Rinderhämoglobin-Polymere herstellbar, die auch bei einem mittleren Polymerisationsgrad von 24 im Plasma ohne jegliche Fällungen löslich sind. Diese Polymere sind aber für eine Anwendung als künstliche Sauerstoffträger auf Grund ihrer Sauerstoff-Bindungseigenschaften völlig ungeeignet (Domack U. (1997), siehe oben).

[0008] Nach dem jetzigen Stand der Technik können mit vielen bifunktionellen Vernetzern keine vernetzten Hämoglobine insbesondere höherer Vernetzungsgrade hergestellt werden, ohne dass nach Mischen mit Plasma unter gewissen Bedingungen mit Unverträglichkeiten in Form von Ausfällungen gerechnet werden muss. Bei physiologischen und pathophysiologischen pH-Werten werden in vitro Unverträglichkeiten zwischen vernetzten Hämoglobinen und Plasmaproteinen beobachtet: Sowohl Plasmaproteine als auch vernetzte Hämoglobine fallen aus, in bestimmten Fällen kann

die Fällung des einen oder des anderen überwiegen. Dies gilt insbesondere für stark vernetzte Hämoglobine (Hämaglobin-Polymer), weniger für geringer vernetzte Hämoglobine-Oligomere. Es ist zu erwarten, daß solche Hämoglobin-Plasmaprotein-Unverträglichkeiten bei Anwendungen in vivo auch im Gefäßsystem auftreten und in extremen Fällen zu multiplen Verschlüssen kleiner Gefäße führen. Um die Funktionstüchtigkeit der Träger zu gewährleisten und schwerwiegende Nebenwirkungen bei der Anwendung im menschlichen oder tierischen Organismus, beispielsweise einen Schock durch kapilläre Stase, zu vermeiden, müssen die vernetzten Hämoglobine mit dem Blut, insbesondere mit den im Plasma enthaltenen Proteinen, verträglich sein, und zwar sowohl unter physiologischen, als auch unter allen möglichen pathophysiologischen Bedingungen: Dies gilt speziell auch für eine Azidose, wie sie lokal in mit Sauerstoff minder versorgtem Gewebe entsteht. Es müssen solche Wechselwirkungen vernetzter Hämoglobine mit Plasmabestandteilen unter allen im Organismus möglichen Bedingungen sicher verhindert werden, die zu einer Ausfällung einer Komponente führen.

[0009] Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, vernetzte Hämoglobine zu erzeugen, für die gewährleistet ist, dass sie nach einer intravasalen Applikation im Organismus mit den Plasmaproteinen – auch unter extremen pathophysiologischen pH-Werten – verträglich sind.

[0010] Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst, indem an die mit einem Vernetzer vernetzten Hämoglobinmoleküle Polyalkylenoxide mäßig hohen Molekulargewichtes kovalent gebunden werden. In einem genügenden Ausmaß kovalent an die vernetzten Hämoglobine geknüpfte Polyalkylenoxide alleine bewirken, dass selbst unter extremen pathophysiologischen pH-Wert-Bedingungen (pH-Werte zwischen 6,8 und 7,4) in vitro keine Unverträglichkeiten von vernetzten Hämoglobinen und Plasmaproteinen in Form von Ausfällen der einen und/oder anderen Komponente feststellbar sind. Dies konnte nicht erwartet werden, da das Problem völlig neu ist und Lösungen ähnlicher oder auch nur analoger Probleme nicht verfügbar sind. Die bekannten Wirkungen einer Anknüpfung von Polyalkylenoxiden an Proteine sind, wie bereits erwähnt, gänzlich andere, als die hier beschriebenen. Darüber hinaus erscheint einerseits eine Kombination sowohl der Vernetzung des Hämoglobins als auch der kovalenten Anknüpfung von Polyalkylenoxid vordergründig als überflüssig: Beide Verfahren bewirken gemäß dem Stand der Technik das selbe, nämlich eine gewisse Verlängerung der intravasalen Verweildauer künstlicher Sauerstoffträger aus modifiziertem Hämoglobin, aber das notwendige Ausmaß wird bereits durch die Durchführung eines der Verfahren erreicht. Andererseits ist bekannt, dass Polyalkylene durch Lösungsmittlexklusion effektive Fällungsmittel für Proteine sind. Darauf beruhen technische Verfahren zur präparativen Trennung von Proteinen durch fraktionierte Fällung während konsekutiver Erhöhung der Konzentrationen der Polyalkylenoxide. Umso überraschender war es, dass bei der erfindungsgemäßen Vorgehensweise das der Anmeldung zugrunde liegende Problem gelöst werden konnte.

[0011] Als Hämoglobin-Ausgangsmaterial für die erfindungsgemäße Lehre eignet sich monomeres, natives oder mit gewissen Effektoren, z. B. der Sauerstoffaffinität des Hämoglobins wie beispielsweise Pyridoxal-5'-Phosphat oder 2-Nor-2-Formyl-Pyridoxal-5'-Phosphat, (wie in Kothe et al. (1985), *Surgery, Gynecology & Obstetrics* 161: 563–569 oder Van Der Plas et al. (1987), *Transfusion* 27: 425–430 und (1988), *Transfusion* 28: 525–530, beschrieben, weitere Zitate in: Rudolph A. S. et al. (Hrsg.): *Red Blood Cell Substitutes: Basic Principles and Clinical Applications*,

Marcel Dekker, New York u. a. 1998; Tsuchida E. (Hrsg.): *Blood Substitutes: Present and Future Perspectives*, Elsevier Science, Amsterdam 1998, Volume 1 und Volume 2, Karger Landes, Basel u. a. 1997 und 1998, vgl. auch EP 0 528 841,

5 dort wird die Pyridoxylierung von Hämoglobin beschrieben), chemisch umgesetztes und modifiziertes Hämoglobin vom Menschen, vom Schwein, oder vom Rind. Bevorzugt ist humanes und insbesondere Schweine-Hämoglobin. Das Hämoglobin kann gegebenenfalls auf bekannte Weise desoxygiert (gegebenenfalls auch karbonyliert) werden.

[0012] Vernetzungen monomeren, nativen oder mit Effektoren verknüpften Hämoglobins mit etlichen Vernetzern sind bekannt und in der Literatur vielfach beschrieben, beispielhaft seien angeführt:

[0013] Die Patentschriften US 4,001,200 und US 4,001,401 betreffen vernetzte Hämoglobine sowie ihren Einsatz als Blutersatz und Plasmaexpander. Die Molekulargewichte (Molaren Massen) dieser vernetzten Hämoglobine betragen von 65 000 bis 1 000 000 g/mol. Sie können mittels einer Vielzahl genannter verknüpfender Agenzien hergestellt werden, wie beispielsweise Divinylsulfon, Epichlorhydrin, Butadienepoxid, Hexamethylendiisocyanat, den Dialdehyden Glyoxal und Glutardialdehyd sowie den Diamidoestern Dimethylsuberimidat, Dimethylmalonimidat und Dimethyladipimidat.

[0014] Die Patentschrift DE 24 49 885 betrifft (u. a.) auch vernetzte Hämoglobine, die durch Umsetzung nicht-vernetzter Hämoglobine mit etlichen Dialdehyden, beispielsweise Malondialdehyd, Succindialdehyd, Glutardialdehyd, 30 Adipindialdehyd und Suberdialdehyd hergestellt werden können.

[0015] Die Patentschrift US 4,857,636 beschreibt die Herstellung verschiedener vernetzter Hämoglobine durch Umsetzung von Hämoglobin mit etlichen Dialdehyden und Polyaldehyden, beispielsweise einfachen wie Glutardialdehyd und Glyoxal, aber auch mit strukturell komplexeren, die durch oxidative Ringöffnung der zyklischen Halbazetal- und Halbketalstrukturen der Zuckermoleküle in Monosacchariden und Oligosacchariden sowie Derivaten dieser entstehen.

[0016] Die Patentschrift US 5,439,882 handelt von vernetzten Hämoglobinen, die durch Umsetzung mit den Dialdehyden o-Adenosin und o-ATP, entstanden durch ringöffnende Oxidation der Ribose in Adenosin und in Adenosintriphosphat, hergestellt sind. Diese vernetzten Hämoglobine besitzen Molekulargewichte von 65 000 bis 390 000 g/mol.

[0017] Die Patentschrift EP 0 201 618 betrifft ein Verfahren, aus hoch konzentrierten Lösungen monomerer Hämoglobine extrem hochmolekulare lösliche Hämoglobinpolymere, sogenannte Hyperpolymere (Molekulargewicht bis 15 000 000 g/mol), herzustellen.

[0018] Die oben beschriebenen Verfahren sind vorstehend inkorporiert.

[0019] Bevorzugt werden bifunktionelle Vernetzer zur Vernetzung der Hämoglobine gewählt, z. B. Butandiepoxid, Divinylsulfon, ein Diisocyanat, insbesondere Hexamethylendiisocyanat, Zyklohexyldiisocyanat und 2,5-Bisisocyanatobenzolsulfosäure, ein Di-N-Hydroxysuccinimidylester, ein Diimidoester, oder ein Dialdehyd, insbesondere Glyoxal, der analog reagierende Glykolaldehyd, oder Glutardialdehyd. Bevorzugt ist Glutardialdehyd.

[0020] Auf eine solche Weise wie im oben beschriebenen Stand der Technik gewonnene, vernetzte, oligomere, polymere oder hyperpolymere Hämoglobine mit Molekulargewichten von etwa 50 000 bis 15 000 000 g/mol und mehr, insbesondere von etwa 50 000 bis 10 000 000 g/mol, gelten erfindungsgemäß als vernetzte Hämoglobine.

[0021] Diese können direkt für die erfindungsgemäße An-

knüpfung von Polyalkylenoxiden eingesetzt werden, wobei dann vernetzte und mit Polyalkylenoxid verknüpfte Hämoglobine entstehen. Alternativ werden die erfundungsgemäß Hämoglobine aus mit Polyalkylenoxid verknüpften (unvernetzten) Hämoglobinen durch Umsetzung mit einem Vernetzer nach einer bekannten Weise, beispielsweise wie in den vorangehend genannten Patentschriften beschrieben, hergestellt. Die möglichen Vorgehensweisen sind weiter unten näher ausgeführt.

[0022] Ganz besonders bevorzugt erfolgt die Vernetzung mit Glutardialdehyd, wie z. B. in Pötzschke H. und Barnikol W. (1992), *Biomaterials, Artificial Cells, and Immobilization Biotechnology* 20: 287-291, oder wie in den nachfolgenden Beispielen beschrieben.

[0023] Jeweils bezogen auf monomeres Hämoglobin werden molare Verhältnisse der verwendetem Vernetzer – insbesondere der bifunktionellen Vernetzer – von 3- bis 60-fach, bevorzugt 6- bis 35-fach, eingesetzt. Bezuglich Glutardialdehyd wird bevorzugt zwischen einem 7- und 10-fachen molaren Überschuss am Glutardialdehyd eingesetzt. Chemisch nicht stabile Verknüpfungen, insbesondere die Schiffsschen Basen, die bei der Reaktion von funktionellen Aldehydgruppen mit Aminogruppen der Hämoglobine entstehen, werden in bekannter Weise reduktiv durch Reaktion mit geeigneten Reduktionsmitteln, wie z. B. Natriumborhydrid, in einem hinreichenden molaren Überschuss, bezogen jeweils auf monomeres Hämoglobin, bevorzugt 2- bis 100-fach, insbesondere bevorzugt 5- bis 20-fach, unter geeigneten bekannten Bedingungen stabilisiert.

[0024] Kovalente Anknüpfungen von Polyalkylenoxiden an Proteine, insbesondere auch an (unvernetztes) Hämoglobin, sind etliche bekannt und in der Literatur beschrieben (den Stand der Technik beschreibt umfassend: Harris J. M. Hrsg.): *Poly (Ethylene Glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications*, Plenum, New York u. a. 1992). Bei sehr vielen dieser Verfahren erfolgt die Anknüpfung des Polyalkylenoxids über eine molekulare Brücke ("spacet"), die beispielsweise ein bifunktioneller Verknüpfungsschafft. Streng betrachtet wird in diesen Fällen also ein Verknüpfungsprodukt eines Polyalkylenoxids mit einem Verknüpfungsreagenz an das Protein geknüpft.

[0025] Zur kovalenten Anknüpfung der Polyalkylenoxide werden bevorzugt solche Derivate der Polyalkylenoxide verwendet, die ein verknüpfendes Agens mit einer funktionellen Gruppe bereits kovalent gebunden enthalten, welche eine direkte chemische Reaktion mit Amino-, Alkohol- oder Sulfhydryl-Gruppen der Hämoglobine unter Bildung kovalenter Anknüpfungen der Polyalkylenoxide ergeben – beispielsweise Polyalkylenoxide mit reaktiven N-Hydroxysuccinimidylester-, Epoxid- (Glycidylether-), Aldehyd-, Isocyanat-, Vinylsulfon-, Jodacetamid-, Imidazolylformatt-, Tresylatgruppen, u. a. Viele solche monofunktionell aktivierte Polyethylenglykole sind kommerziell erhältlich, z. B. die genannten, und zwar mit Molekulargewichten zwischen etwa 500 und 5000 g/mol.

[0026] Bevorzugt werden erfundungsgemäß Derivate eines Polyalkylenoxids, insbesondere ausgewählt aus Polyethylenoxid, Polypropylenoxid oder Kopolymeren hiervon, eingesetzt. Besonders bevorzugt sind Verknüpfungsprodukte des Polyalkylenoxids, insbesondere der genannten, mit einem eine terminale Hydroxygruppe maskierenden Molekül, insbesondere einem Ether, Ester, Esteramid mit kurzkettigen (C_1-C_5) aliphatischen organischen Rest eingesetzt. Alternativ können nicht-aktive Polyalkylenoxide in jeder weiteren geeigneten Weise zunächst chemisch aktiviert oder, eventuell nach einer zusätzlich notwendigen Derivatisierung, durch chemische Verknüpfungssagenzen mit dem Hämoglobin verknüpft werden, beispielsweise mittels che-

mischer Reaktion mit Bromcyan, einem Karbodiimid wie beispielsweise 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)karbodiimid oder N,N'-Dizyklohexylkarbodiimid, Cyanurchlorid (mit diesem aktivierte Polyethylenglykole, 4,6-Dichlor-s-triazin-Polyethylenglykole, sind ebenfalls kommerziell erhältlich), oder anderen, bekannten Verknüpfungssagenzen wie beispielsweise 2,2'-Dichlorbenzidin, p,p'-Difluor-m,m'-dinitrodiphenylsulfon, 2,4-Dichlornitrobenzol und weiteren (Überblick in: Harris J. M. (Hrsg.): *Poly (Ethylene Glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications*, Plenum, New York u. a. 1992).

[0027] Als Polyalkylenoxide eignen sich besonders Polyethylenoxide (Polyethylenglykole), Polypropylenoxide (Polypropylenglykole), sowie Kopolymeren (Mischpolymere) aus Ethylenoxid und Propylenoxid, insbesondere, wie erwähnt, gewisse Derivate dieser, wie eine Hydroxygruppe maskierende Verbindungen, beispielsweise (Mono-)Ether mit einem kurzkettigen Alkohol, vorzugsweise mit 1 bis 5 Kohlenstoffatomen, wie Monomethylether, Monoethyl-ether, Monopropylether, u. s. w., (Mono-)Ester mit kurzkettigen Karbonsäuren, vorzugsweise mit 1 bis 5 Kohlenstoffatomen, wie Monomethylester, Monomethylester, Monopropylester, u. s. w. und Dehydratisierungsprodukte mit einem aliphatischen Amin mit 1 bis 5 Kohlenstoffatomen, wie

25 Monomethylamin, Monoethylamin, Monopropylamin, u. s. w. mit dem oben angegebenen. Besonders bevorzugt sind Polyethylenglykole und deren genannte Derivate. Das Molekulargewicht der verwendeten Polyalkylenoxide beträgt bevorzugt zwischen 200 und 5000 g/mol, insbesondere

30 zwischen 500 und 2000 g/mol.

[0028] Diese werden vorzugsweise in einer Menge von 1 bis 40, insbesondere 4 bis 15 mol pro Mol Hämoglobin eingesetzt.

[0029] Wie bereits erwähnt ist die Anbindung von Polyalkylenoxiden an Proteine (z. B.: Patent US 4,179,337 (1979): "Non-immunogenic Polypeptides"), speziell auch an Hämoglobin, namentlich auch an künstliche Sauerstoffträger auf der Basis modifizierter Hämoglobine, bekannt (Patentschriften US 5,478,805 (1995): "Fractionation of Polyalkylene Oxide-Conjugated Hemoglobin Solution", US 5,386,014 (1995): "Chemically Modified Hemoglobin as an Effective, Stable, Non-immunogenic Red Blood Cell Substitute", EP-A 0 206 448 (1986): "Hemoglobin Combined with a Poly (Alkylene Oxide)", EP-A 0 067 029 (1982): "Oxygen Carrier"). Der Inhalt dieser Schriften ist daher vorliegend inkorporiert. Die Anknüpfung von Polyalkylenoxiden an künstliche Sauerstoffträger auf der Basis modifizierter Hämoglobine wurde nach der bekannten Literatur allerdings nie an einem vernetzten Hämoglobin vorgenommen, und diente 45 immer dem Erreichen gänzlich anders gearteter Ziele, beispielsweise einer Verlängerung der intravasalen Verweildauer, oder auch zur Verminderung der immunogenen Potenz der künstlichen Sauerstoffträger.

[0030] Die Durchführung der erfundungsgemäß Anknüpfungen ist analog wie oben beschrieben und richtet sich nach den Erfordernissen der gewählten chemischen Reaktionen: Native und modifizierte, monomere und vernetzte Hämoglobine sind Polyelektrolyte und befinden sich deshalb zur Reaktion mit aktiven Polyalkylenoxiden oder zur verknüpfenden Umsetzung mit Polyalkylenoxiden mittels Aktivatoren oder Verknüpfungssagenzen in wässrigen Elektrolyten mit Ionenkonzentrationen bis 300 mmol/L, vorzugsweise zwischen 50 und 170 mmol/L. Die Temperaturen während der Reaktionen betragen zwischen 2 und 65°C, bevorzugt zwischen 3 und 30°C, die Protonenaktivität in den Lösungen, ausgedrückt als pH-Werte, zwischen 5 und 11, bevorzugt zwischen 6,0 und 10,5 und die Reaktionszeiten, je nach der gewählten speziellen Reaktion zur Anknüpfung der

jeweiligen Polyalkylenoxide an die entsprechenden Hämoglobine, auch in Abhängigkeit von Temperatur, pH-Wert, Ionenkonzentration usw., zwischen wenigen Minuten und bis zu 24 Stunden, bevorzugt weniger als 5 Stunden und ganz bevorzugt weniger als 2 Stunden.

[0031] Das noch nicht vernetzte Hämoglobin oder das vernetzte Hämoglobin können somit mit Hilfe der bekannten Methoden mit Polyalkylenoxid verknüpft werden, wie oben beschrieben, beispielsweise durch direkte Kombination mit Hilfe eines Kondensationsmittels, wie Bromcyan, oder mit Hilfe eines Vernetzungsreagens, wie beispielsweise Cyanurchlorid (vgl. DE-OS 30 26 398), oder durch Reaktion mit einem aktivierten Polyalkylenoxid, beispielsweise einem N-Hydroxysuccinimidylester eines Polyalkylenoxidderivates. Auf diese Weise werden mindestens 1, insbesondere 1 bis 40 und vorzugsweise 4 bis 15 Moleküle des erfindungsgemäß verwendeten Polyalkylenoxids je Molekül monomeren Hämoglobins verknüpft.

[0032] Beispielhaft können folgende Verfahren für die Anknüpfung der Polyalkylenoxide angewendet werden, wobei deren strukturelle Integrität erhalten bleibt:

(1) (Nicht aktiviertes) Polyethylenglykol wird mit der 2- bis 5-fachen molaren Menge, vorzugsweise der 3-fachen molaren Menge an Bromcyan bei einem pH-Wert von 9 bis 10 umgesetzt. Das restliche Bromcyan wird durch Gelfiltration, Dialyse etc. aus dem Reaktionsgemisch entfernt und das Produkt wird dann mit einer erforderlichen, z. B. 0,1- bis 0,002-fachen, vorzugsweise der 0,02- bis 0,01-fachen molaren Menge an Hämoglobin bei pH 7 bis 9, vorzugsweise 7,5 bis 8, in wässriger Lösung umgesetzt (vgl. DE-OS 30 26 398);

(2) Polyethylenglykol wird in Benzol gegeben, welches eine überschüssige Menge an Natriumkarbonat enthält, und dann mit der 2- bis 5-fachen molaren Menge, vorzugsweise der 3- bis 4-fachen molaren Menge an Cyanursäurechlorid umgesetzt. Das Reaktionsprodukt, Polyethylenglykol-4,6-dichlor-s-triazin, wird abgetrennt und mit der gewünschten Menge, z. B. 1 bis 0,002 mol, vorzugsweise 0,1 bis 0,01 mol, bezogen auf ein Mol des vorstehend genannten Reaktionsprodukts, an Hämoglobin in einer Pufferlösung mit einem pH-Wert von 8 bis 9,5 umgesetzt (vgl. DE-OS 30 26 398);

(3) Aktiviertes Polyalkylenoxid, beispielsweise ein N-Hydroxysuccinimidylester eines Polyalkylenoxids, wird in einem 1- bis 40-fachen molaren Überschuss bezogen auf monomeres Hämoglobin zu einer wässrigen Lösung mit einem pH zwischen 7 und 10 eines mit dem Polyalkylenoxid zu verknüpfenden Hämoglobins gegeben und reagieren lassen.

[0033] Die vorstehend erläuterten Methoden lassen sich auch im Fall der anderen erfindungsgemäß verwendeten Polymeren anwenden.

[0034] Die chemische Anbindung der Polyalkylenoxide an die künstlichen Sauerstoffträger aus vernetzten Hämoglobinen kann im Verlauf der Herstellung der erfindungsgemäßen Hämoglobin-Derivate zu drei Zeiten erfolgen:

i) Im ersten Fall wird das Polyalkylenoxid-Derivat an die hochreinen, nativen oder modifizierten Hämoglobine (Hämoglobin-Monomere) gebunden, im Anschluss daran erfolgt dann die Vernetzung der Hämoglobine mit einem insbesondere bifunktionellen Vernetzer.

ii) Im zweiten Fall werden Polyalkylenoxid-Derivate an das bereits synthetisierte vernetzte Hämoglobin an-

gekoppelt, d. h. im Anschluss an die Umsetzung der hochreinen, nativen oder mit Effektoren modifizierten Hämoglobin-Monomere mit einem bifunktionellen Vernetzer.

iii) Im dritten Fall schließlich kann eine kovalente Anbindung von Polyalkylenoxid-Derivaten sowohl an die Hämoglobin-Monomeren vor deren Vernetzung, als auch zusätzlich danach, im weiteren Verlauf der Herstellung, an das vernetzte Hämoglobin durchgeführt werden.

[0035] Das erhaltene erfindungsgemäße Hämoglobin-Derivat kann auf bekannte, übliche Weisen gereinigt werden, z. B. durch Zentrifugation, Klärfiltration, Ultrafiltration oder eine préparative Chromatographie, z. B. Volumenausschlusschromatographie beispielsweise an Sephadex G-25 Gel oder wie in den obengenannten Druckschriften, oder EP-A 0 854 151, EP-A 95 107 280 oder in Curling J. M.: Methods of Plasma Protein Fractionation, Academic Press, London, 1980, beschrieben.

[0036] Vorzugsweise wird monomeres Hämoglobin, bevorzugt im desoxygениerten Zustand, in einem wässrigen Elektrolyten (der z. B. NaHCO₃ oder NaCl oder Natriumlaktat oder mehrere dieser enthält), zunächst vernetzt, beispielsweise mit bifunktionellen Vernetzern wie Butandiepoxid, Divinylsulfon, einem Diisocyanat, insbesondere Hexamethylendiisocyanat, Zyklohexyldiisocyanat und 2,5-Bisisocyanatobenzolsulfonsäure, einem Di-N-Hydroxysuccinimidylester, einem Diimidoester, oder einem Dialdehyd, insbesondere Glyoxal, dem analog reagierenden Glykolaldehyd, und ganz besonders bevorzugt Glutardialdehyd, z. B. in einem 3- bis 60-fachen, bevorzugt einem 6- bis 35-fachen molaren Überschuss bezogen auf monomeres Hämoglobin, insbesondere einem 7- bis 10-fachen molaren Überschuss im Falle des Glutardialdehyd. Überschuss-Reaktanden können auf übliche Weise durch geeinete Zusätze entfernt werden, z. B. durch Zusatz von Natriumcyanoborhydrid oder Natriumborhydrid im Falle der Dialdehyde (wie beispielsweise Glutardialdehyd) z. B. in einem 2- bis 100-fachen, insbesondere einem 5- bis 20-fachen molaren Überschuss, bezogen wiederum auf das monomere Hämoglobin.

[0037] Das erhaltene vernetzte Hämoglobin in Lösung kann sodann direkt mit einem der oben genannten Polyalkylenoxide, beispielsweise einem Polyethylenglykol, einem Polypropylenglykol, oder einem Kopolymerisat aus Ethylenoxid und Propylenoxid oder einem der obengenannten Derivate hiervon, insbesondere einem aktivierten Polyethylenglykol wie Methoxy-Polyethylenglykol-N-Hydroxysuccinimidylpropionat (mPEG-SPA), wie beschrieben verknüpft werden. Dazu wird das Polyalkylenoxid im Überschuss, z. B. im 1- bis 40-fachen, insbesondere vorzugsweise im 4- bis 15-fachen molaren Verhältnis bezogen auf monomeres Hämoglobin, eingesetzt. Der verbleibende Überschuss kann auf bekannte Weise wieder entfernt oder inaktiviert werden, z. B. durch Umsetzung mit überschüssigem Lysin. Die Polyalkylenoxide haben eine molare Masse von 200 bis 5 000, insbesondere 500 bis 2 000 g/mol.

[0038] Die so erhaltene Lösung kann dann auf geeignete bekannte Weise, z. B. chromatographisch (z. B. durch préparative Volumenausschluss-Chromatographie) durch Zentrifugation, (Klär-) Filtration oder Ultrafiltration, oder durch Fällung, z. B. mit Polyethylenglykol, gereinigt und nachfolgend zu einer pharmazeutischen Zubereitung weiterverarbeitet werden.

[0039] Alternativ kann auch zunächst die kovalente Anknüpfung des Polyalkylenoxids wie geschildert und erst anschließend die Vernetzung wie beschrieben erfolgen. Schließlich kann eine kovalente Anknüpfung eines Poly-

kylenoxids auch sowohl zunächst vor der Vernetzung, als auch zusätzlich nach der Vernetzung erfolgen. Auf- und Weiterverarbeitung können auch bei diesen Alternativen unverändert wie beschrieben durchgeführt werden.

[0040] Die Elektrolytkonzentration und damit auch der pH-Wert kann jeweils entsprechend den erforderlichen Bedingungen wie beschrieben auf bekannte Weise eingestellt werden.

[0041] Auf diese Weise wird als Produkt ein vernetztes und mit Polyalkylenoxid verknüpftes Hämoglobin erhalten, welches mit Plasma auch unter extremen physiologischen Bedingungen insbesondere des pH-Wertes überraschenderweise völlig verträglich ist. Die Verträglichkeit ist dabei unabhängig von der Art und dem Molekulargewicht des Hämoglobins, vom verwendeten Vernetzer, Effektoren oder der Art des eingesetzten Polyalkylenoxids.

[0042] Dies konnte im Hinblick auf den Stand der Technik nicht erwartet werden, da dort sowohl durch kovalente Anknüpfung von Polyalkylenoxiden als auch durch Vernetzung in vivo lediglich eine verbesserte Verweilzeit bzw. eine geringere Immunogenität, jedoch Keine Plasmaverträglichkeit, erzielt wurde.

[0043] Die überraschenden Vorteile des erfindungsgemäßen Hämoglobin-Derivates lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Kovalent an vernetztes Hämoglobin angeknüpftes Polyalkylenoxid ergibt mit Plasma verträgliche künstliche Sauerstoffträger. Die Plasmaverträglichkeit dieser vernetzten Hämoglobine ist dabei nicht vom verwendeten Hämoglobin, von der Molekülgröße der vernetzten Hämoglobine, oder vom Vernetzer abhängig.

2. Durch die Anbindung der Polyalkylenoxide an die vernetzten Hämoglobine wird auch unter ungünstigen pH-Wert-Bedingungen sicher gestellt, daß im Organismus nicht mit Wechselwirkungen zwischen Plasmaproteinen und vernetzten Hämoglobinen gerechnet werden muß, die zu Fällungen der vernetzten Hämoglobine oder von Plasmaproteinen führen.

3. Die Modifikation vernetzten Hämoglobins mit Polyalkylenoxid erlaubt die intravasale Anwendung von vernetzten Hämoglobinen hoher Multimerisationsgrade (Hämoglobin-Polymeren) – ohne eine solche Anbindung wäre nur eine Applikation von Oligomeren möglich, um Fällungerscheinungen oder anderweitige Wechselwirkungen beispielsweise mit Proteinen, aber auch mit den Blutzellen im Plasma zu vermeiden. Diesen Hämoglobin-Polymeren erschließen sich damit, neben der Anwendung als Substitut verlorenen Blutvolumens, weitere Anwendungsgebiete aus dem Bereich chronischer Sauerstoffmangelzustände. Auf Grund ihrer hohen molekularen Größe können sie einem Patienten als zusätzlicher Sauerstoffträger – als ein Sauerstoff transportierendes Additiv – gegeben werden.

4. Zudem lässt die Anbindung von Polyalkylenoxiden eine erhöhte vaskuläre Verweildauer, wie auch eine verringerte Immunogenität erwarten.

[0044] Insofern können die erfindungsgemäßen Hämoglobin-Derivate als solche oder in Form geeigneter, z. B. pharmazeutischer Zubereitungen als künstliche Sauerstoffträger intravasal als Pharmazeutikum oder für biomedizinische Zwecke, als Ersatz des Blutes zur Behandlung eines Blutvolumenmangels, als Zusatz zum Blut zur Behandlung pathogener Sauerstoffmangelzustände, oder als eine Nährlösung, im menschlichen oder tierischen Organismus, in Organen oder in biotechnischen Anwendungen, verwendet werden.

Zur Herstellung der zu verabreichenden Produkte werden die erfindungsgemäßen Hämoglobin-Derivate in geeigneten Medien, wie Infusionslösungen, beispielsweise in wässriger Kochsalz- oder Glukoselösung, vorzugsweise in dem Blutplasma isotonischen Konzentrationen, gelöst.

[0045] Besonders bevorzugte Ausgestaltungen der Erfindung werden nachfolgend zunächst anhand eines allgemeinen Herstellungsverfahrens der vernetzten und mit Polyalkylenoxid verknüpften Hämoglobine näher erläutert:

1. Gereinigtes Schweine-, Human- oder Rinderhämoglobin mit einer Konzentration zwischen 10 und 420 g/L, bevorzugt zwischen 150 und 400 g/L, ist in einer wässrigen Natriumhydrogenkarbonat-Lösung gelöst, diese besitzt eine Konzentration zwischen 10 und 150 mmol/L, bevorzugt zwischen 40 und 60 mmol/L. Durch Überströmen mit reinem Stickstoff und Röhren dieser Hämoglobinlösung erfolgt bei einer Temperatur aus dem Bereich von 2 bis 42°C, bevorzugt zwischen 3 und 25°C, eine Desoxygenierung des Hämoglobins. Der pH der Lösung wird mit Milchsäure oder Natronlauge (einer Konzentration zwischen 0,1 und 1 mol/L) auf einen Wert zwischen 6 und 9, bevorzugt zwischen 6,5 und 7,5 titriert.

2. Bei dem so eingestellten pH-Wert erfolgt dann die Reaktion des Hämoglobins mit einem bifunktionellen Vernetzer, ausgesucht aus Butandiepoxid, Divinylsulfon, einem Diisocyanat, insbesondere Hexamethylen-diisocyanat, Zyklohexyldiisocyanat und 2,5-Bisisocyanatobenzolsulfonsäure, einem Di-N-Hydroxysuccinimidylester, einem Dürmidocster, oder einem Dialdehyd, insbesondere Glyoxal, dem analog reagierenden Glykolaldehyd, und ganz besonders bevorzugt Glutardialdehyd. Das molare Verhältnis des Vernetzers zum monomeren Hämoglobin beträgt zwischen 3 und 60, bevorzugt zwischen 6 und 35. Nach Vernetzung mit einem der genannten Dialdehyde werden z. B. die entstandenen Schiffsschen Basen mit Natriumborhydrid, in einem molaren Verhältnis zum monomeren Hämoglobin zwischen 2 und 100, bevorzugt zwischen 5 und 20, reduziert. Diese Reduktion erfolgt bei einem pH zwischen 7,5 und 9, bevorzugt zwischen 7,8 und 8,8; dieser pH-Wert wird, wie oben (Nr. 1) beschrieben, mit Natronlauge oder Milchsäure eingestellt.

3. Nach erneuter Einstellung der pH-Werte zwischen 7 und 9,5 (mit Natronlauge oder Milchsäure) werden die vernetzten Hämoglobine mit einem der o. g. Polyalkylenoxid-Derivate verknüpft, das in einem molaren Verhältnis zum monomeren Hämoglobin von 1 bis 40, bevorzugt zwischen 4 und 15, dem Reaktionsgemisch zugegeben wird. Die Molekulargewichte der verwendeten Polyalkylenoxide betragen zwischen 200 und 5000 g/mol, bevorzugt zwischen 500 und 2000 g/mol. Die Polyalkylenoxide können bereits, wie oben erwähnt, zur Reaktion insbesondere mit Aminogruppen der Hämoglobine monofunktionell aktiviert sein, oder, wie ebenfalls beschrieben, aktiviert oder passiv angeknüpft werden.

60 [0046] Die Reaktionsfolge kann alternativ auch, wie bereits beschrieben, geändert werden, und zwar kann monomeres Hämoglobin zunächst mit einem Polyalkylenoxid zur Reaktion gebracht werden, und erst danach die Vernetzung, oder schließlich ist auch eine zweimalige Anknüpfung von Polyalkylenoxiden möglich, die Reaktionsfolge ist dann 1 – 3 – 2 – 3.

[0047] Die Erfindung wird anhand nachfolgender Beispiele näher erläutert. Hierbei zeigen die Fig. 1 bis 6 folgen-

des:

Fig. 1

[0048] Eine massen-gewichtete Verteilung der Molekülgroßen und Molekulargewichte (M) des Glutardialdehyd-Schweinehämoglobin-Polymeren aus Beispiel 1, dargestellt als Volumenausschluss-Chromatogramm (erhalten mit Sephadryl S-400 HR-Gel, Pharmacia, Freiburg, D). $E_{425\text{ nm}}$ ist die Extinktion im Chromatographie-Eluat bei 425 nm, V_E das Elutionsvolumen, Vitamin B₁₂ dient als Referenzsubstanz (innerer Standard).

Fig. 2

[0049] Ergebnisse des in vitro-Verträglichkeitstests einer Mischung der Schweinehämoglobin-Polymeren aus Beispiel 1 mit humanem Plasma (isovolämische Mischung), dargestellt als Änderung der relativen Hämoglobinkonzentrationen in Abhängigkeit vom pH-Wert nach Ansäuerung mit Milchsäure ●: Schweinehämoglobin-Polymer (ohne kovalent angeknüpftes Polyalkylenoxid), ■: Schweinehämoglobin-Polymer mit kovalent gebundenem PEG-1000, ♦: Schweinehämoglobin-Polymer mit kovalent gebundenem PEG-2000.

Fig. 3

[0050] Eine massen-gewichtete Verteilung der Molekülgroßen und Molekulargewichte (M) des fraktionierten Glutardialdehyd-Humanhämoglobin-Polymeren aus Beispiel 2, dargestellt als Volumenausschluss-Chromatogramm (erhalten mit Sephadryl S-400 HR-Gel, Pharmacia, Freiburg). $E_{425\text{ nm}}$ ist die Extinktion im Chromatographie-Eluat bei 425 nm, V_E das Elutionsvolumen, Vitamin B₁₂ dient als Referenzsubstanz (innerer Standard).

Fig. 4

[0051] Ergebnisse des in vitro-Verträglichkeitstests einer Mischung der fraktionierten Humanhämoglobin-Polymeren aus Beispiel 2 mit humanem Plasma (isovolämische Mischung), dargestellt als Änderung der relativen Hämoglobinkonzentrationen in Abhängigkeit vom pH-Wert nach Ansäuerung mit Milchsäure ●: Humanhämoglobin-Polymer (ohne kovalent angeknüpftes Polyalkylenoxid), ■: Humanhämoglobin-Polymer mit kovalent gebundenem PEG-1000.

Fig. 5

[0052] Eine massen-gewichtete Verteilung der Molekülgroßen und Molekulargewichte (M) des fraktionierten Glutardialdehyd-Rinderhämoglobin-Polymeren aus Beispiel 3, dargestellt als Volumenausschluss-Chromatogramm (erhalten mit Sephadryl S-400 HR-Gel, Pharmacia, Freiburg). $E_{425\text{ nm}}$ ist die Extinktion im Chromatographie-Eluat bei 425 nm, V_E das Elutionsvolumen, Vitamin B₁₂ dient als Referenzsubstanz (innerer Standard).

Fig. 6

[0053] Ergebnisse des in vitro-Verträglichkeitstests einer Mischung der fraktionierten Rinderhämoglobin-Polymeren aus Beispiel 3 mit humanem Plasma (isovolämische Mischung), dargestellt als Änderung der relativen Hämoglobinkonzentrationen in Abhängigkeit vom pH-Wert nach Ansäuerung mit Milchsäure ●: Rinderhämoglobin-Polymer

(ohne kovalent angeknüpftes Polyalkylenoxid), ■: Rinderhämoglobin-Polymer mit kovalent gebundenem PEG-1000.

5

Beispiel 1

Kovalente Anknüpfung monofunktionellen N-Hydroxy-Succinimidylpropionat-Polyethylenglykols (mPEG-SPA) mit Molaren Massen von 1000 g/mol (mPEG-SPA-1000) und 2000 g/mol (mPEG-SPA-2000) an kovalent vernetztes Schweinehämoglobin

[0054] Die Synthese der vernetzten Schweinehämoglobine erfolgte (leicht modifiziert) gemäß den Vorschriften aus

15 Dinkelmann S. ("Präparation und in vitro Charakterisierung eines künstlichen Sauerstoffträgers auf der Basis von Schweinehämoglobin und seine Evaluierung im Kleintier", Dissertation, Fachbereich Medizin, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz 1997, vgl. auch Pötzschke H. et al., Art. 20 Cells, Blood Subst. and Immob. Biotechn. 25 (1997), 527-540) und Domack U. ("Entwicklung und in vivo-Evaluation eines künstlichen Sauerstoffträgers auf Basis von Rinderhämoglobin", Dissertation, Fachbereich Chemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz 1997): Hochreines, 25 konzentriertes, desoxygениertes Schweinehämoglobin gelöst in einem wässrigen Elektrolyten der Zusammensetzung 50 mmol/L NaHCO₃ und 100 mmol/L NaCl wurde bei Raumtemperatur mit dem 14-fachen molaren Überschuss an Glutardialdehyd umgesetzt. Natriumcyanoborhydrid, im 10-fachen molaren Überschuss zum (monomeren) Hämoglobin zugesetzt, reduzierte die bei der Vernetzung entstandenen Schiffsschen Basen und stabilisierte die kovalente Vernetzung. Die erhaltene Lösung der vernetzten Hämoglobine wurde in drei Teile (A, B und C) geteilt und unterschiedlich 35 weiter verarbeitet.

[0055] Teil A blieb unverändert, die Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung (gemäß Pötzschke H. et al. (1996): "Vernetzte globuläre Proteine – eine neue Klasse halbsynthetischer polymerer Moleküle: Charakterisierung ihrer Struktur in Lösung am Beispiel hyperpolymeren Hämoglobins und Myoglobins mittels Volumenausschluss-Chromatographie, Viskosität, Osmometrie und Lichtstreuung", Macromolecular Chemistry and Physics 197, 1419-1437, sowie Pötzschke H. et al. (1996): "Ein neuartiges Verfahren zur Bestimmung Molarer Massen breit verteilter Polymerer mit Hilfe der Gel-Chromatographie und der Viskosität am Beispiel Hämoglobin-Hyperpolymer", Macromolecular Chemistry and Physics 197, 3229-3250) unter Anwendung der Volumenausschluss-

50 Chromatographie mit dem Gel Sephadryl S-400 HR (Pharmacia Biotech, Freiburg, D) ergab für das vernetzte Schweinehämoglobin (Abb. 1 zeigt ein Chromatogramm) einen Modalwert der Molekulargewichtsverteilung von 520 kg/mol.

[0056] Die Polymeren des Anteils B wurden mit monofunktionell aktivem mPEG-SPA-1000 (Shearwater Polymers Europe, Enschede, NL) kovalent verknüpft: Zunächst wurde Natriumhydrogencarbonat als Festsubstanz bis zu einer Endkonzentration von 150 mmol/L zur Lösung der ver-

60 netzten Hämoglobine addiert, anschließend erfolgte die Zugabe von mPEG-SPA-1000 im 12-fachen molaren Überschuss (bezogen auf die Hämoglobin-Monomeren) ebenfalls als Festsubstanz. Nach einer Reaktionszeit von einer Stunde wurde Lysin im 60-fachen molaren Überschuss (bezogen auf Hämoglobin) zugegeben und reagierte mit noch aktiven mPEG-SPA-1000-Molekülen.

Teil C

Mit der Lösung der vernetzten Hämoglobine wurde genauso verfahren wie für Teil B beschrieben, jedoch unter Verwendung von mPEG-SPA-2000 (Shearwater Polymers Europe, Enschede, NL).

[0057] Anschließend erfolgte ein Lösungsmitteltausch in den drei Lösungen A, B und C (mit Hilfe einer Ultrafiltration, "Ultraminisette 10 kDa", Pall Gelman Sciences, Roßdorf, D, oder einer Volumenausschluss-Chromatographie am Gel "Sephadex G-15 M", Pharmacia Biotech, Freiburg, D) zu einer Lösung in einem wässrigen Elektrolyten (StLg) der Zusammensetzung: 125 mM NaCl, 4,5 mM KCl und 3 mM Na₃N₃.

[0058] Die Untersuchung der Plasmaverträglichkeit des nicht modifizierten (A), sowie des mit PEG modifizierten vernetzten Schweinehämoglobins (B und C) erfolgte mittels eines standardisierten in vitro-Füllungstests (Domack U. (1997), s. o.). Die Hämoglobinlösungen wurden mit gleichen Mengen frisch gewonnenen, steril filtrierten menschlichen Plasmas gemischt und anschließend zu jeweils 500 µL der Mischung bis zu 20 µL 0,5-molare Milchsäure zugesetzt und eingemischt, so dass sich für jedes zu untersuchende Hämoglobin-Derivat jeweils pH-Werte aus einem Bereich zwischen etwa 7,4 bis 6,8 ergaben. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei Raumtemperatur und Zentrifugation der Proben erfolgte die Bestimmung des Hämoglobin gehaltes (modifizierte Cyanhämoglobin-Methode nach Drabkin: "Hämoglobin-Farbtest MRP 3", Boehringer Mannheim, D) und des zugehörigen pH-Wertes (Blutgasanalysator "ABL 5", Radiometer, Willich, D) im Überstand.

[0059] In Abb. 2 sind die relativen Hämoglobinkonzentrationen (bezogen auf die Ausgangs-Hämoglobinkonzentration vor Milchsäurezugabe) in Abhängigkeit vom pH-Wert der Hämoglobin-Plasma-Mischung dargestellt, Verminde rungen ergeben sich durch Ausfällung nicht verträglicher Anteile. Für pH-Werte kleiner 7,0 wurden bei der Probe A (nicht modifiziertes Schweinehämoglobin-Polymer) rote Fällungen beobachtet, die sich als Abnahme der Hämoglobinkonzentration darstellen. Für dieses vernetzte Schweinehämoglobin ist im pH-Intervall von 7,4 bis 6,8 auch in vivo mit solchen Unverträglichkeiten zu rechnen. Dagegen waren bei den mit PEG modifizierten vernetzten Hämoglobinen B und C keine Fällungen im physiologisch interessanten Bereich zwischen den pH-Werten 7,4 und 6,8 und darüber hinaus noch bis 5,5 zu beobachten, der Hämoglobin gehalt nahm nicht ab.

[0060] Im physiologisch und pathophysiologisch interessanten pH-Bereich von 7,4 bis 6,8 konnte somit durch das kovalente Anbinden sowohl von PEG-1000 als auch von PEG-2000 an vernetzte Schweinehämoglobine ein wirksamer Schutz dieser, als auch der Plasmaproteine vor durch Wechselwirkungen verursachten Fällungen erreicht werden.

Beispiel 2

Kovalentes Anknüpfen von mPEG-SPA-1000 (N-Hydroxy-Succinimidylpropionat-Polyethylen glykol mit einer Molaren Masse von 1000 g/mol) an vernetztes Humanhämoglobin

[0061] Die Synthese des mit Glutardialdehyd vernetzten Humanhämoglobins erfolgte wie in Beispiel 1, jedoch unter Verwendung von hochreinem, konzentrierten Humanhämoglobin und Einsatz des 16-fachen molaren Überschusses des Vernetzers. Polymere wurden durch Fraktionieren der Lösung der Vernetzungsprodukte mit Hilfe einer präparativen

Volumenausschluss-Chromatographie (gemäß EP-A 95 10 72 80.0: "Verfahren zur Herstellung molekular-einheitlicher hyperpolymerer Hämoglobine" mit Sephacryl S-300 HR-Gel, Pharmacia Biotech, Freiburg, D) gewonnen (hier als die zuerst eluierten 57 Massen-% des vernetzten Hämoglobins).

[0062] Die vernetzten Hämoglobine wurden in zwei Teile A und B aufgeteilt. Das Hämoglobin A (vergleiche Abb. 3) erwies sich als überwiegend polymeres Hämoglobin mit einem Modalwert der Molekulargewichtsverteilung von 950 kg/mol (vergleiche Beispiel 1). Kovalentes Anbinden von monofunktionell aktivem mPEG-SPA-1000 erfolgte analog der in Beispiel 1 für vernetztes Schweinehämoglobin beschriebenen Vorgehensweise: Nach der Addition von Natriumhydrogenkarbonat (bis zu 150 mM) zur Lösung der Polymeren konnte ein 12-facher molarer Überschuss mPEG-SPA-1000 mit den Hämoglobin-Monomeren reagieren. Im Anschluß an eine Reaktionszeit von einer Stunde wurde Lysin im 60-fachen molaren Überschuss zum, "Abfangen" noch aktiver Moleküle des mPEG-SPA-1000 zugegeben. Als Vorbereitung zum in-vitro Biokompatibilitätstest folgte das Umlöschen (Lösungsmitteltausch) der Lösungen A und B in den wässrigen Elektrolyten "StLg" (ganz analog wie im Beispiel 1 beschrieben).

[0063] Der Füllungstest – die Ergebnisse sind in Abb. 4 dargestellt – ergab für die vernetzten Hämoglobine A im gesamten untersuchten pH-Intervall von 7,9 bis 5,1 rote Fällungen. So fielen beispielsweise im Falle der Simulation einer Azidose mit einem pH-Wert von 6,8 ca. 8% der Hämoglobinpolymeren aus. Bei einem pH von 5,7 wird ein Maximum der Fällungen erreicht. Allerdings die Modifikation mit mPEG-1000 verhindert das Auftreten von Hämoglobin-Präzipitaten bis weit in den sauren Bereich, bis zu einem pH von 5,7.

Beispiel 3

Kovalentes Anknüpfen von mPEG-SPA-1000 an vernetztes Rinderhämoglobin

[0064] Die Herstellung der vernetzten Rinderhämoglobine erfolgte durch Vernetzen von hochreinem, konzentrierten Rinderhämoglobin mit einem 14-fachen molaren Überschuss Glutardialdehyd gemäß Beispiel 1, eine molekulare Fraktionierung der Syntheseprodukte, das Anbinden von mPEG-SPA-1000 und die präparative Vorbereitung zur in vitro-Füllungstitration gemäß Beispiel 2. Eine Molekulargewichtsverteilung des nicht modifizierten Hämoglobin-Polymeren zeigt Abb. 5, nämlich ein Eluogramm einer Volumenausschluss-Chromatographie (am Gel "Sephacryl S-400 HR", Pharmacia Biotech, Freiburg, D), der Modalwert der Molekulargewichtsverteilung beträgt hier 810 kg/mol.

[0065] Im in vitro – Füllungstest (die Ergebnisse zeigt Abb. 6) wurden für das fraktionierte, nicht modifizierte Rinderhämoglobin-Polymer im pH-Intervall von 7,9 bis 5,3 Hämoglobinpolymer-Fällungen beobachtet. Die Probengefäße der mit PEG modifizierten fraktionierten Rinderhämoglobin-Polymeren mit pH-Werten zwischen 8,0 und 6,7 enthielten dagegen nach Zentrifugation keine Zentrifugate.

[0066] Durch das kovalente Anknüpfen von PEG-1000 wird die Plasmaverträglichkeit des vernetzten Rinderhämoglobins so erhöht, dass eine parenterale Verabreichung möglich ist, da mit Ausfällungen in vivo nicht gerechnet werden muss.

Patentansprüche

1. Mit menschlichem und tierischem Plasma verträgli-

ches Hämoglobin-Derivat, dadurch gekennzeichnet, dass das Hämoglobin mittels eines Vernetzers für Proteine vernetzt sowie mit Polalkylenoxid kovalent verknüpft ist.

2. Mit Plasma verträgliches Hämoglobin-Derivat gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Hämoglobin menschlichen Ursprungs, vom Rind oder vom Schwein ist.

3. Mit Plasma verträgliches Hämoglobin-Derivat gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass an das Hämoglobin ein Derivat eines Polyalkylenoxids, ausgewählt aus Polyethylenoxid, Polypropylenoxid, oder Kopolymeren aus Ethylenoxid und Propylenoxid, geknüpft ist.

4. Mit Plasma verträgliches Hämoglobin-Derivat gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Derivat des Polyalkylenoxids ein Verknüpfungsprodukt eines Polyalkylenoxids mit einem Molekül ist, das eine reagible Hydroxylgruppe an einem strukturellen Ende des Polyalkylenoxids markiert.

5. Mit Plasma verträgliches Hämoglobin-Derivat gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Polyalkylenoxid-Derivat ein Ether, ein Ester, oder ein Esteramid mit einem kurzkettigen aliphatischen organischen Rest ist.

6. Mit Plasma verträgliches vernetztes Hämoglobin-Derivat gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass das kovalent angeknüpfte Polyalkylenoxid eine Molare Masse zwischen 200 und 30 5000 g/mol, vorzugsweise zwischen 500 und 2000 g/mol besitzt.

7. Hämoglobin-Derivat nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Anzahl der angeknüpften Polyalkylenoxide zwischen 1 und 40 Moleküle Polyalkylenoxid pro Molekül des Hämoglobinmonomeren beträgt.

8. Hämoglobin-Derivat nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Anzahl der angeknüpften Polyalkylenoxide zwischen 4 und 15 Moleküle Polyalkylenoxid pro Molekül des Hämoglobinmonomeren beträgt.

9. Hämoglobin-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass das Hämoglobin mittels eines bifunktionellen Vernetzers für Proteine vernetzt ist

10. Hämoglobin-Derivat nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass das Hämoglobin mittels eines bifunktionellen Vernetzers für Proteine, ausgewählt aus Butandiepoxid, Divinylsulfon, einem Diisocyanat, insbesondere Hexamethylendiisocyanat, Zyklohexyldiisocyanat und 2,5-Bisisocyanatobenzolsulfonsäure, einem Di-N-Hydroxysuccinimidylester, einem Diimidoester, oder einem Dialdehyd, insbesondere Glyoxal, dem analog reagierenden Glykolaldehyd und Glutaraldehyd vernetzt ist.

11. Hämoglobin-Derivat nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass das Hämoglobin mittels Glutaraldehyd vernetzt ist.

12. Hämoglobin-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass das vernetzte Hämoglobin Molekulargewichte von 50 000 bis 10 000 000 g/mol aufweist.

13. Verfahren zur Herstellung von Hämoglobin-Derivaten als künstliche Sauerstoffträger, die mit menschlichem/tierischem Blutplasma verträglich sind, dadurch gekennzeichnet, dass das Hämoglobin sowohl vernetzt, als auch Polyalkylenoxid kovalent angeknüpft wird.

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass entweder

i) zunächst an Hämoglobin Polyalkylenoxid kovalent angeknüpft und dieses mit Polyalkylenoxid verknüpfte Hämoglobin dann vernetzt wird, oder

ii) zunächst das Hämoglobin vernetzt und dann an das vernetzte Hämoglobin kovalent Polyalkylenoxid angeknüpft wird, oder

iii) zunächst an Hämoglobin Polyalkylenoxid kovalent angeknüpft, dieses mit Polyalkylenoxid verknüpfte Hämoglobin dann vernetzt und an dieses mit Polyalkylenoxid verknüpfte und vernetzte Hämoglobine erneut Polyalkylenoxid kovalent angeknüpft wird.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, dass Hämoglobine vom Menschen, Rind oder Schwein eingesetzt werden.

16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass das Hämoglobin vom Schwein stammt.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass Hämoglobin in einer wässrigen Elektrolytlösung sowohl mit einem 3- bis 60-fachen molaren Überschuss, bezogen auf monomeres Hämoglobin, eines bifunktionellen Vernetzers für Proteine vernetzt, als auch mit einem 1- bis 40-fachen molaren Überschuss, bezogen auf monomers Hämoglobin, eines Polyalkylenoxids kovalent verknüpft wird und anschließend der Überschuss an Reaktanden entfernt und das Produkt gereinigt wird.

18. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass der bifunktionelle Vernetzer für Proteine aus Butandiepoxid, Divinylsulfon, einem Diisocyanat, insbesondere Hexamethylendiisocyanat, Zyklohexyldiisocyanat und 2,5-Bisisocyanatobenzolsulfonsäure, einem Di-N-Hydroxysuccinimidylester, einem Diimidoester, oder einem Dialdehyd, insbesondere Glyoxal, dem analog reagierenden Glykolaldehyd und Glutaraldehyd ausgewählt ist.

19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass der bifunktionelle Vernetzer für Proteine Glutaraldehyd ist.

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass als Polyalkylenoxid ein Derivat eines Polyethylenoxids, Polypropylenoxids, oder Kopolymeren aus Ethylenoxid und Propylenoxid eingesetzt wird.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass die verwendeten Polyalkylenoxide eine Molare Masse zwischen 200 und 5000 g/mol, vorzugsweise zwischen 500 und 2000 g/mol besitzen.

22. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 21, dadurch gekennzeichnet, dass die Anzahl der pro Hämoglobin-Monomer der vernetzten Hämoglobine zur kovalenten Anknüpfung zugegebenen Polyalkylenoxidmoleküle zwischen 1 und 40, vorzugsweise zwischen 4 und 15 beträgt.

23. Verwendung eines mit Plasma verträglichen vernetzten Hämoglobins gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12 oder hergestellt gemäß einem der Ansprüche 13 bis 22 zur Herstellung eines Mittels zur intravasalen oder biomedizinischen Anwendung als künstlicher Sauerstoffträger.

24. Verwendung gemäß Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass das Mittel in Form einer pharmazeutischen Zubereitung als ein Ersatz des Blutes, oder als ein Zusatz zum Blut oder zu einer Nährösung, im menschlichen und tierischen Organismus, in einzelnen

Organen, oder in biotechnischen Anwendungen verwendet wird.

Hierzu 6 Seite(n) Zeichnungen

5

10

15

20

25

30

35

40

45

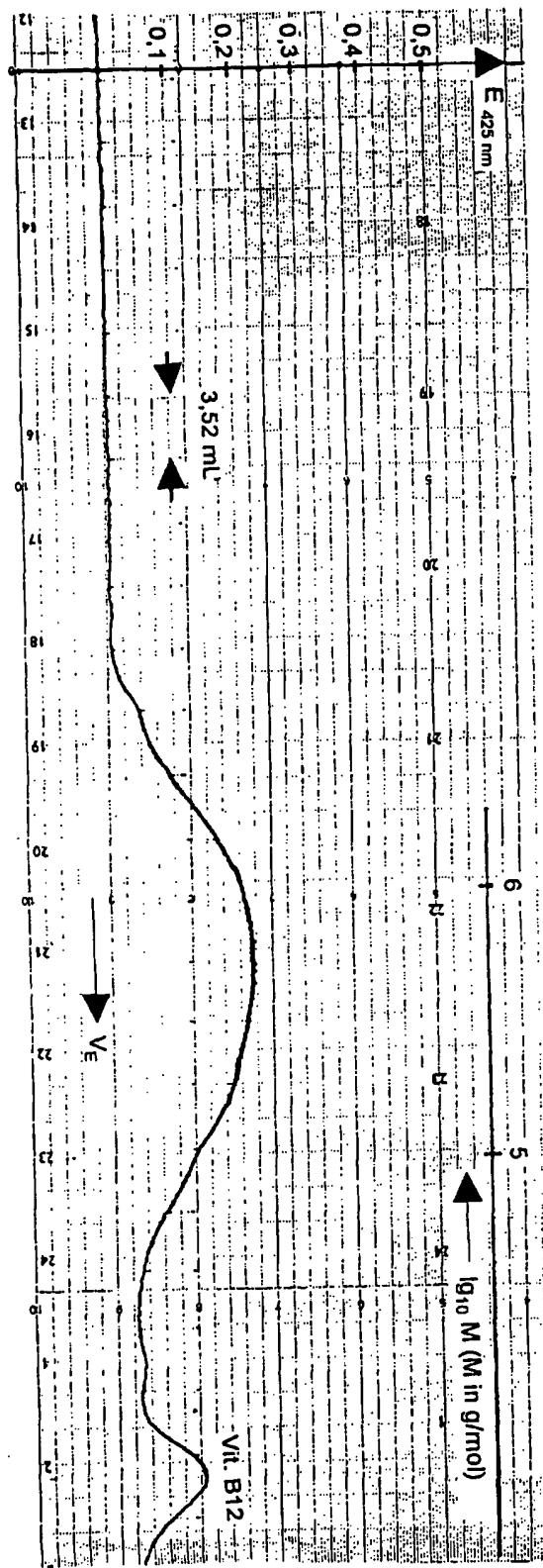
50

55

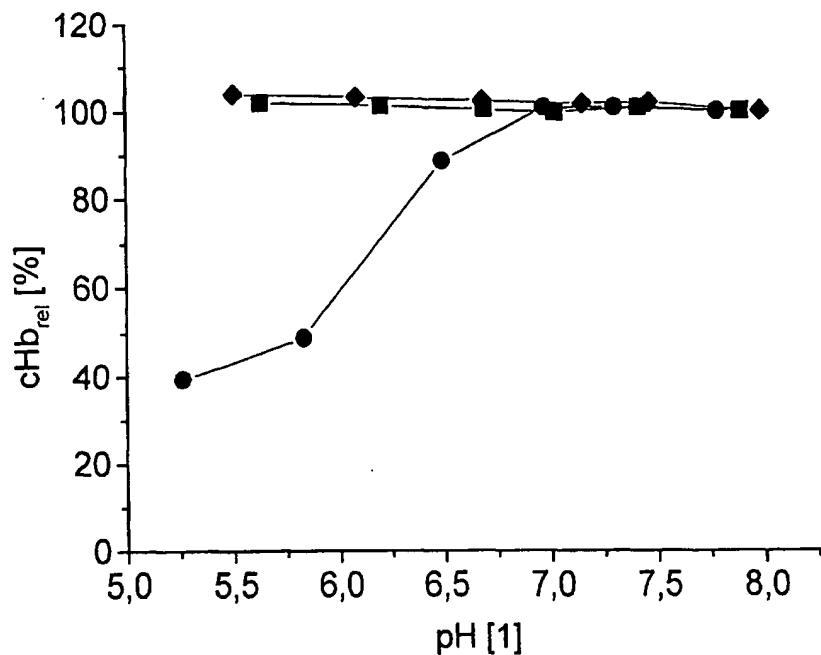
60

65

- Leerseite -

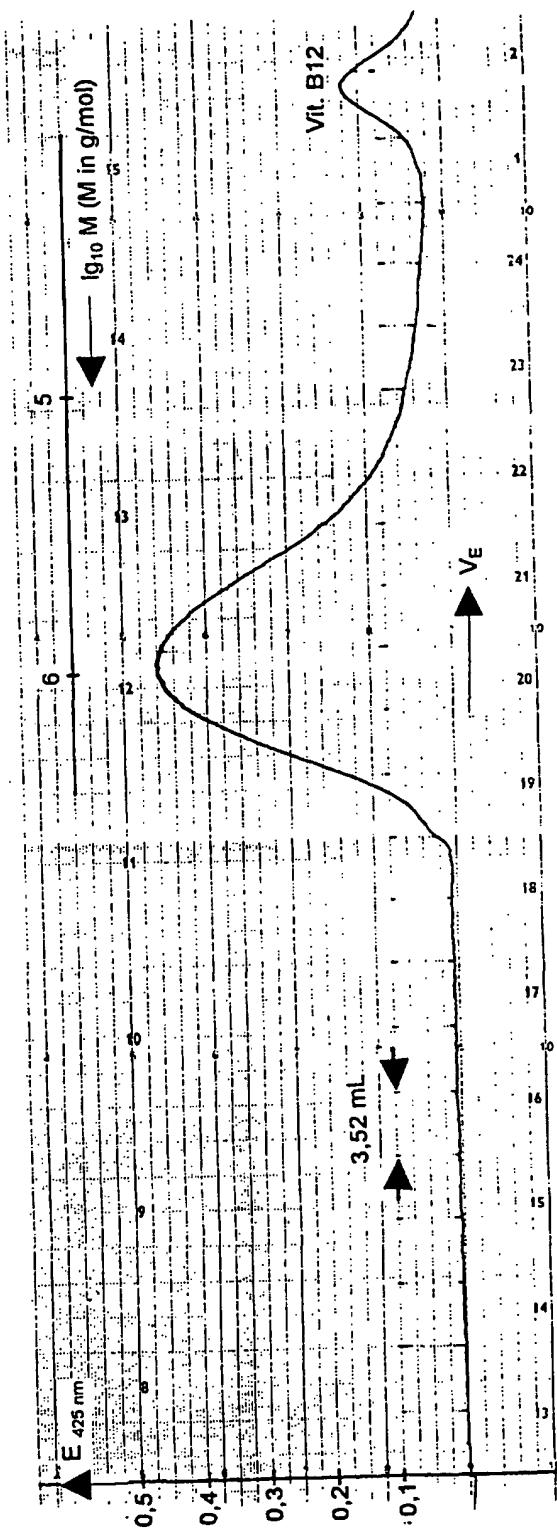


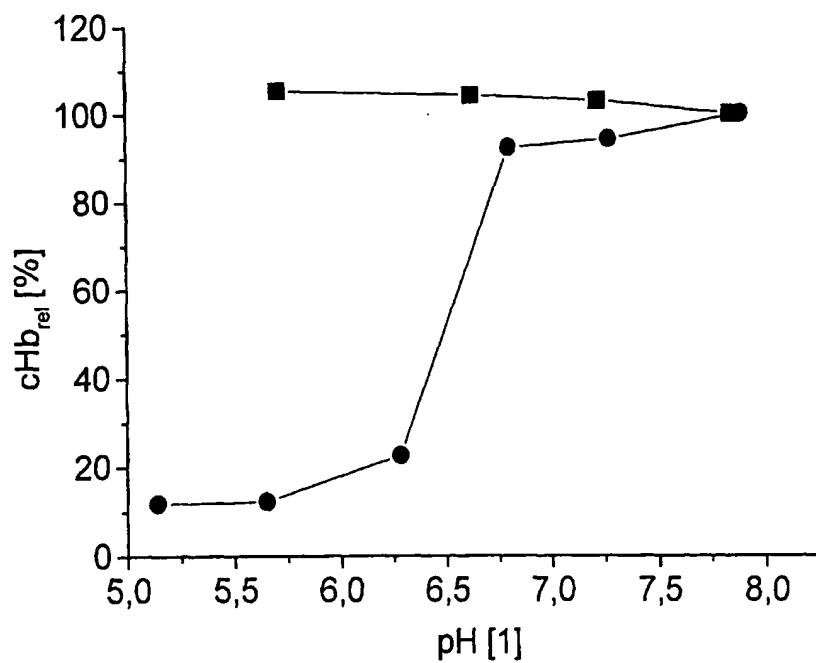
Figur 1



Figur 2:

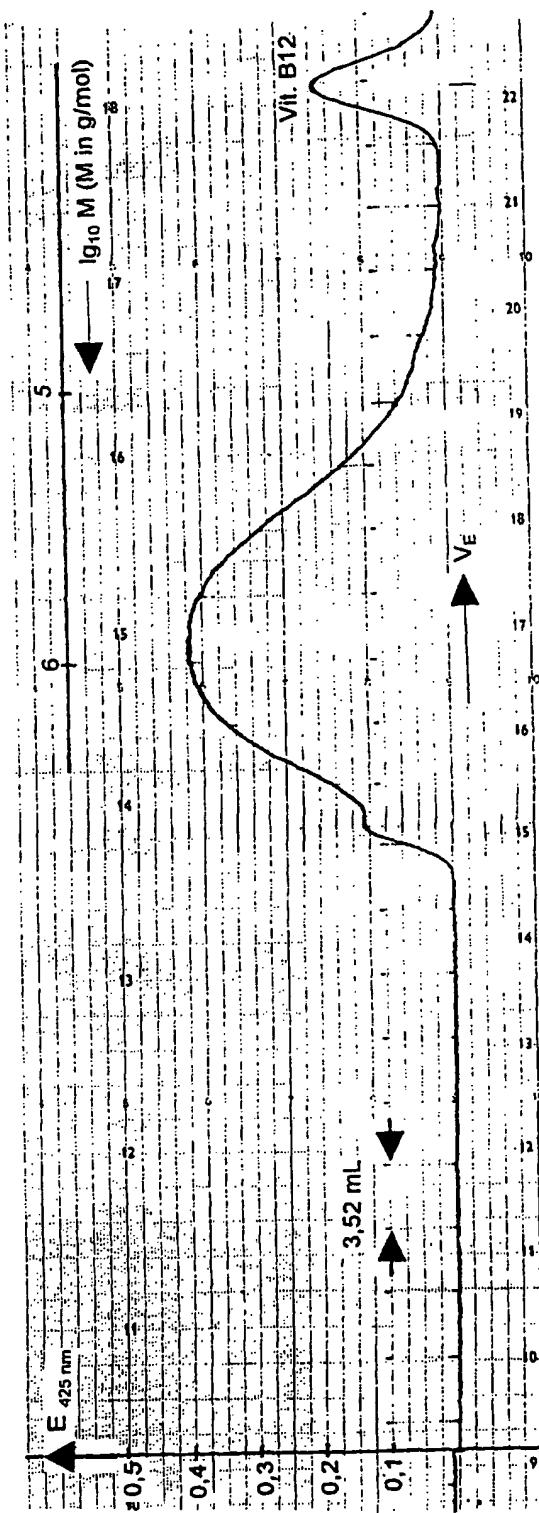
Figure 3

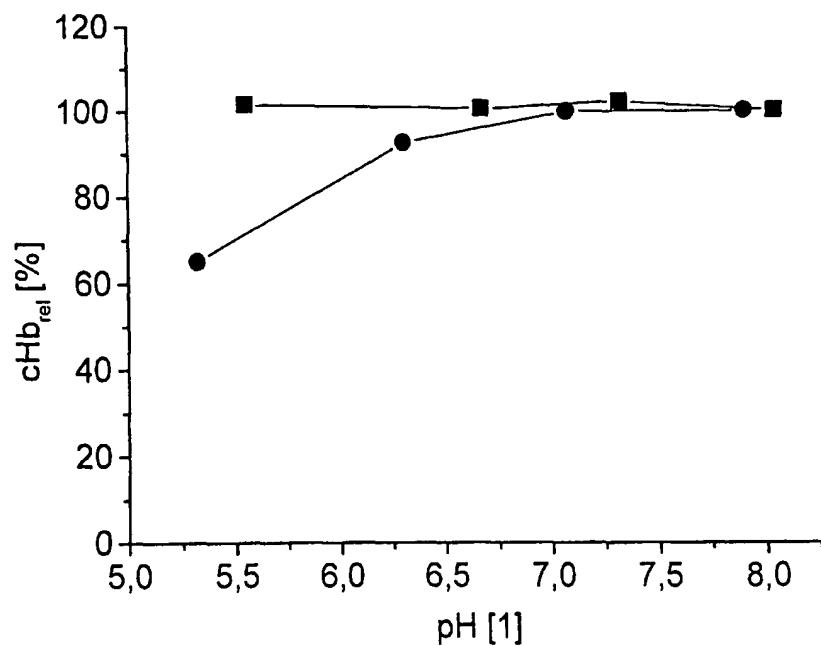




Figur 4:

5 ឧណ្ឌទេ





Figur 6:

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.